



Hydrolysis method and utilization of aminoacyl-naphtylamide as diagnosis reagent, by measuring the fluorescence of 2-naphtylamine freed by the hydrolytic action of aminopeptidases, related with certain pathological conditions of the organism, such as the biochemical diagnosis of hepatic cirrhosis. The method comprises the dissolution of the substrate into dimethylsulfoxide which, appropriately supplemented, is mixed with the appropriate quantity of serum to be analyzed, incubated at 37 °C during an accurately measured period of time, whereafter the reaction is freed by adding an acetate buffer. The reading is performed in a spectrofluorometer with an excitation of 345 nm and an emission of 412 nm.

+ DESIGNACIONES DE "SU"

Toda designación de "SU" surte efecto en la Federación de Rusia. Aún no se sabe si una designación de esa índole surte efecto en los demás Estados de la antigua Unión Soviética.

UNICAMENTE PARA INFORMACION

Códigos utilizados para identificar a los Estados parte en el PCT en las páginas de portada de los folletos en los cuales se publican las solicitudes internacionales en el marco del PCT.

AT	Austria	ES	España	MG	Madagascar
AU	Australia	FI	Finlandia	ML	Mali
BB	Barbados	FR	Francia	MN	Mongolia
BE	Bélgica	GA	Gabón	MR	Mauritania
BF	Burkina Faso	GB	Reino Unido	MW	Malawi
BG	Bulgaria	GN	Guinea	NL	Países Bajos
BJ	Benin	GR	Grecia	NO	Noruega
BR	Brasil	HU	Hungría	PL	Polonia
CA	Canadá	IT	Italia	RO	Rumania
CF	República Centroafricana	JP	Japón	SD	Sudán
CG	Congo	KP	República Popular Democrática de Corea	SE	Suecia
CH	Suiza	KR	República de Corea	SN	Senegal
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SU ⁺	Unión Soviética
CM	Camerún	LK	Sri Lanka	TD	Chad
CS	Checoslovaquia	LU	Luxemburgo	TG	Togo
DE	Alemania	MC	Mónaco	US	Estados Unidos de América
DK	Dinamarca				

Título

Procedimiento de hidrólisis y utilización de aminoacil-2-naftilamida como reactivo de diagnóstico.

Campo de la técnica

- 5 Síntesis orgánica y diagnóstico clínico.

Introducción

En la sangre circulante pueden detectarse una variedad de actividad de aminopeptidasas que difieren entre sí en su grado de especificidad y en su origen celular. En general no se conoce
10 la función de estas enzimas en el suero, si bien se asume que podrían estar más o menos específicamente encargadas de la desnaturalización (o activación) de péptidos circulantes.

Como sucede con otras actividades enzimáticas determinadas en sangre, la actividad de las distintas aminopeptidasas podrían
15 reflejar la funcionalidad de las células de donde proceden; en tal sentido se ha propuesto que los niveles alterados de determinadas aminopeptidasas reflejan distintos estados patológicos y su determinación podría colaborar al diagnóstico y ser un índice de la evolución de la enfermedad [SANDERINK G.J.,
20 ARTUR Y., SIEST G. (1.988). Human aminopeptidases : a review of the literature. J: Clin. Chem. Clin. Biochem., 26, 795-807].

La actividad de aminopeptidasas se determina con relativa facilidad utilizando sustratos artificiales del tipo de las aminoacil-2-naftilamidas, si bien dada la variable especificidad
25 de estas enzimas, para determinar los niveles de una aminopeptidasa específica es necesario o un proceso de purificación previo, o una inhibición de la actividad de todas las restantes, lo que dificultaría la técnica de determinación y alargaría el tiempo necesario para realizar la misma.

30 La presente invención utiliza la relación de la actividad de determinadas aminopeptidasas en distintos procesos patológicos, lo que constituye un procedimiento útil para el diagnóstico

35 a) Las aminopeptidasas. El estudio de la enzima proteolítica tuvo su origen a finales del siglo pasado en los laboratorios alemanes con el descubrimiento de cambios en la composición quí-

mica de los tejidos cuando estos se almacenaban, incluso aunque fuese impedida la intervención bacteriana.

Durante muchos años se ha conocido que las enzimas proteolíticas, en condiciones apropiadas, podrían sintetizar enlaces peptídicos. Tal idea dio nuevo ímpetu a las investigaciones sobre estas enzimas durante la década de los 40 cuando se introdujeron /7los sustratos sintéticos para su determinación. Fruton et al., [FRUTON J.S., IRVING G.W., BERGMANN M. (1.941). On the proteolytic enzymes of animal tissues. II. The composite nature of beef spleen cathepsin. J. Biol. Chem., 138, 249-262. FRUTON J.S., IRVING G.W., BERGMANN M. (1.941). On the proteolytic enzymes of animal tissues. III. The proteolytic enzymes of beef-spleen, beef kidney and swine kidney classification of the cathepsins. J. Biol. Chem., 141, 763-774.] utilizaron Z-Glu-Tyr (Z-: Benziloxycarbonil-), Bz-Arg-NH₂ (Bz-: Benzoil-) y Leu-NH₂ como sustratos, respectivamente, de la catepsina I, II y III. Esta última fue posteriormente reconocida como una aminopeptidasa y red denominada leucina aminopeptidasa.

Las exopeptidasas citosólicas se encuentran entre las primeras proteasas en ser descubiertas [BARRETT A.J., McDONALD J.K. (1.980). Mammalian proteases. A glossary and bibliography. Volume 1. Endopeptidasas. Academic Press. London]. La fuente original de muchas exopeptidasas fueron las preparaciones de mucosa intestinal, donde se comprobó que contenían una mezcla compleja de enzimas de diversa especificidad. Tras las aminopeptidasas de origen intestinal se encontró que el riñón era una fuente aún más abundante de actividad aminopeptidásica [SPACKMAN D.H., SMITH E.L., BROWN D.M. (1.955). Leucine aminopeptidase IV. Isolation and properties of the enzyme from swine kidney. J. Biol. Chim., 212, 255-269], al igual que el cristalino y la pulpa dental. En 1964, Hopsu et al. [HOPSU V.K., KANTONEN U.M., GLENNER G.G. (1.964). A peptidase from rat tissue selectively hydrolyzing N-terminal arginine and lysine residues. Life. Sci., 3, 1.449-1.453] detectaron en los extractos de hígado de rata una nueva aminopeptidasa citosólica dependiente de iones cloro y sulfhidrilos que fue denominada aminopeptidasa B (arginil aminopeptidasa) debido a su estricta especificidad por residuos

de arginina y lisina de péptidos y derivados de la naftilamida. Parece ser la contrapartida de la carboxipeptidasa B. La denominada alanina aminopeptidasa fue descubierta en hígado resultando ser dependiente de cobalto y sensible a la puromicina [BEHAL F.J., KLEIN R.A., DAWSON F.B. (1.966). Separation and characterization of aminopeptidase and arylamidase components of human liver. Arch. Biochem. Biophys., 115, 545-554] pero su especificidad de sustrato contrastaba con la de la aminopeptidasa B en que la mayoría de los residuos N-terminales de los péptidos eran sensibles a su acción, aunque la alanina era el residuo preferido. Por otro lado, Cheung y Cushman [CHEUNG H.S., CUSHMAN D.W. (1.971). A soluble aspartate aminopeptidase from dog kidney. Biochim. Biophys. Acta, 242, 190-193] identificaron una nueva aminopeptidasa en riñón específica para los residuos aspártico y glutámico N-terminales. A esta enzima se le dio el nombre de aspartato aminopeptidasa.

b) Determinación de aminopeptidasas. La detección de una verdadera aminopeptidasa con garantía absoluta de su naturaleza exige métodos de determinación que pudieran resultar engorrosos, ya que se necesitaría la presencia de un péptido sustrato para la enzima, de secuencia conocida y en estado prácticamente puro, y del manejo de técnicas sofisticadas tales como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) o los analizadores de aminoácidos. Menos problemáticas resultarían las técnicas de cromatografía en capa fina o en papel, aunque en estos casos existirían problemas de cuantificación de la actividad enzimática.

Tales técnicas pueden ser utilizadas actualmente, y de hecho algunos investigadores las utilizan para demostrar la actividad de una aminopeptidasa purificada sobre un determinado péptido, pero no estaban al alcance de los investigadores de hace cincuenta años. Estos decidieron perfeccionar las primitivas técnicas que se realizaba midiendo el pH de la solución y medir la actividad aminopeptidásica utilizando sustratos artificiales hidrolizables por estas enzimas y cuyos productos fuesen fácilmente detectables y medibles.

El primer sustrato artificial utilizado para la determinación de una aminopeptidasa fue la L-leucilamida [LINDERSTROM-LANG K. (1.929). *Über darmerepsin. Hoppe-Seylers. Z. Physiol. Chem.*, 182, 151-174. Citado en BARRETT A.J., McDONALD J.K., 1.986]. Inmediatamente se sugirió el nombre de leucina aminopeptidasa para esta enzima, dado que no hidrolizaba los derivados N-acetilados de la leucinamida. Pronto se puso también de manifiesto que la enzima no restringía su actividad al aminoácido leucina, y que existían otras amidas sintéticas y péptidos hidrolizables por la misma enzima. Los métodos de determinación de los productos de la hidrólisis de la L-leucinamida, leucina y amoniaco, son muy variados. Dado que el pH óptimo de la reacción es de 8-9 y que a pH 7.4 la enzima no muestra prácticamente actividad, es dudoso que la actividad de hidrólisis de L-leucinamida sea la misma que la detectada con otros sustratos artificiales y, por tanto, la clásica leucina aminopeptidasa, es distinguible de otras aminopeptidasas que funcionan a pH próximo a la neutralidad.

Sin lugar a dudas, los sustratos artificiales más usados para la determinación de aminopeptidasas han sido los derivados amídicos de la 2-naftilamina, las aminoacil-2-naftilamidas. Estos sustratos fueron introducidos por primera vez por Gomori [GOMORI G. (1.954). *Chromogenic substrates for aminopeptidase. Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 87, 559-561], y desde entonces se han obtenido derivados de todos los aminoácidos, de muchos dipéptidos e, incluso, compuestos que han permitido la detección de diversas endopeptidasas mediante el bloqueo del grupo amino terminal del aminoácido con diversos compuestos.

En principio, la 2-naftilamina liberada por acción enzimática se acoplaba con una sal diazólica para producir un color rojo o azul (dependiendo de la sal de acoplamiento considerada), y se medía espectrofotométricamente a 520 nm. Este método se ha aplicado también a la determinación histoquímica de aminopeptidasas [Gomori, o.c., 1954].

c) Las aminopeptidasas en el suero.

LEUCIL AMINOPEPTIDASA. La actividad de la leucil aminopeptidasa (LAP) (E.C.3.4.11.1), localizada preferentemente

en el citosol de la práctica totalidad de las células, se ha encontrado en suero y plasma humanos y de otros animales.

ASPARTIL AMINOPEPTIDASA. No existen referencias en la literatura sobre la presencia de esta enzima en tejidos distintos
5 del riñón. Incluso se duda que exista como tal enzima y la actividad hidrolítica sobre aspartil-2NNap sea debida a la glutamil aminopeptidasa [Cheung y Cushman, o.c, 1971].

ALANIL AMINOPEPTIDASA. La actividad de esta enzima se encuentra en suero en forma de varias isoenzimas que podrían ser
10 marcadores de enfermedades particulares [SANDERINK G.J., ARTUR Y., PAILLE F., SIEST G. (1.989). Clinical significance of a new isoform of serum alanine aminopeptidase; relationship with liver disease and alcohol consumption. Clin. Chim. Acta., 179, 23-32]. La AAP en plasma parece proceder fundamentalmente del hígado;
15 concretamente se localizaría en la superficie externa de la membrana plasmática de las células de los canalículos biliares. Es posible, sin embargo, que pueda proceder de cualquier tipo de célula dañada, dada su ubicua localización en el organismo.

ARGINIL AMINOPEPTIDASA. La actividad de esta enzima
20 (E.C.3.4.11.6) se encuentra en suero a muy baja concentración por lo que resulta difícilmente detectable. Probablemente procede de los elementos formes de la sangre, leucocitos y eritrocitos donde se encuentra en alta concentración [SÖDERLING E. (1.982). Effect of Cl^- on the function of the Cl^- activated arginine
25 aminopeptidase purified from human erythrocytes. Arch. Biochem. Biophys., 216, 105-115].

PROLIL AMINOPEPTIDASA. La actividad de prolil-aminopeptidasa (E.C.3.4.11.5.) debe corresponder con la de la enzima que hidroliza fácilmente poliprolina y Pro-2NNap, tal como fue
30 inicialmente descrita [SARID S., BERGER A., KATCHALSKI E. (1.962). Proline iminopeptidase II. Purification and comparison with iminodipeptidase (prolinase). J. Biol. Chem., 237, 2.207-
2.214]. No existen referencias en la literatura donde se

51 GLUTAMIL AMINOPEPTIDASA. Esta enzima
inicialmente confundida con la leucina naftilamidasa en suero hasta que Nagatsu et. al [NAGATSU I., NAGATSU T., YAMAMOTO T.,

- GLENNER G.G., MEHL J.W. (1.970). Purification of aminopeptidase A in human serum and degradation of angiotensin II by the purified enzyme. Biochim. Biophys. Acta., 198, 255-270] consiguieron separarla y demostrar su existencia como enzima con actividad independiente de la anterior. Su función en el suero pudiera ser la degradación del octapéptido angiotensina II y por tanto una posible angiotensinasa. Durante el embarazo los niveles de glutamil aminopeptidasa aumentan en suero así como su actividad específica [LALU K., LAMPELO S., NUMMELIN-KORTELAINE
- 10 M. VANHA-PERTTULA T. (1.984). Purification and partial characterization of aminopeptidase A from the serum of pregnant and non-pregnant women. Biochim. Biophys. Acta., 789, 324-333]. Se ha propuesto que esta enzima podía proceder de la placenta y ser una de las implicadas en la inactivación del sistema renina-angiotensina durante la gestación, [MIZUTANI S., YAMADA R., KURAUCHI O., ITO Y., NARMA O., TOMODA Y. (1987). Serum aminopeptidase A (AAP) in normal pregnancy and pregnancy complicated by pre-eclampsia. Arch. Gynecol., 240, 27-31].

CISTINIL AMINOPEPTIDASA. Los niveles sanguíneos de esta enzima (E.C.3.4.11.3) parecen proceder predominantemente de la placenta y se liberan a la circulación materna a partir del segundo trimestre de forma progresiva, llegan a un máximo al final del embarazo y descienden tras el parto [SPELLACY N.N., USATEGUI-GOMEZ M., FERNANDEZ de CASTRO A. (1.977). Plasma human placental lactogen, oxytocinase, and placental phosphatase in normal and toxemic pregnancies. Am. J. Obstet. Gynecol., 127, 10-16]. Se cree que su función es la de impedir el inicio prematuro de las contracciones uterinas destruyendo la oxitocina. Este incremento progresivo de la actividad enzimática suele ser inadecuado y errático en embarazos anormales. Se ha propugnado que la medida de su actividad durante la gestación podría ser un medio de evaluar la función feto-placentaria [CHAPMAN L., SILK E., SKUPNY A., TOOTH E., BARNES A. (1.971). Spectrofluorimetric assay of serum cystine aminopeptidase in normal and diabetic pregnancy compared with total oestrogen excretion. J. Obst. Gynaecol. Br. Commonw., 78, 435-443]. Hay otras aminopeptidasas en el suero que poseen ligera actividad oxitocinásica, pero son

inhibibles por bestatina [MIZUTANI S., KURAUCHI O., YAMADA R., NARITA O., TOMODA Y. (1.986). Effects of bestatin, its related compounds puromycin and bacitracin on human oxytocinase and human microsomal placental leucine aminopeptidase. IRCS. Med. Sci., 14, 270-271]. No conocemos alteraciones de la actividad de esta enzima en suero en condiciones patológicas.

DIPEPTIDIL AMINOPEPTIDASA I. La presencia de dipeptidil aminopeptidasa I (DAP I) (E.C.3.4.14.1) en sueros normales y patológicos ha sido exhaustivamente estudiada por Vanha-Perttula y Kalliomaki [VANHA-PERTTULA T., KALLIOMÄKI J.L. (1.973). Comparison of dipeptide arylamidase I and II amino acid arylamidase and acid phosphatase activities in normal and pathological sera. Clin. Chim. Acta., 44, 249-258.]. Los autores refieren un incremento de los niveles normales de la enzima en desordenes hepáticos en general, en enfermedades arteriales periféricas, neoplasias, diabetes mellitus e hipertrofia prostática. No encuentran diferencias significativas en los casos de pancreatitis. Así mismo encuentran una correlación negativa de los niveles de esta enzima con la edad, sin que existan diferencias entre hombres y mujeres. Dada su naturaleza lisosomal se supone que su actividad debería estar aumentada en suero en todos aquellos procesos donde exista lesión celular y estos autores propugnan su posible utilización como ayuda en el diagnóstico clínico.

DIPEPTIDIL AMINOPEPTIDASA II. La actividad de esta enzima (E.C.3.4.14.2) en suero ha sido también estudiada por Vanha-Perttula y Kalliomaki [o.c., 1973] encontrándose elevada en procesos tromboembólicos, alcoholismo e hipertrofia prostática. Los autores encuentran una correlación positiva con la edad y una diferencia significativa a favor de las mujeres con respecto a los hombres. Su distribución entre distintos tejidos es diferente, por lo que no existe una correlación entre ellos en suero. En el suero se encuentra una correlación positiva entre la actividad de esta enzima y la de la DAP I. Este hecho puede ser un signo de la liberación simultánea de los mismos desde los tejidos lesionados, independientemente de su origen [Vanha-Perttula y Kalliomaki, o.c., 1973].

DIPEPTIDIL AMINOPEPTIDASA III. La actividad de la dipeptidil aminopeptidasa III (DAP III) (E.C.3.4.14.4), como las de las previas DAP, ha sido escasamente estudiada. El estudio de los niveles de esta enzima en suero y su comparación con suero retroplacentario Shimamori [SHIMAMORI Y., WATANABE Y., FUJIMOTO Y. (1.986). Specificity of a membrane-bound neutral endopeptidase from rat kidney. Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)., 34 (1), 275] mostró que la actividad enzimática se encontraba elevada notablemente en dicho suero retroplacentario en relación con los controles.

DIPEPTIDIL AMINOPEPTIDASA IV. La presencia de esta enzima en suero de animales y humanos está ampliamente demostrada [KASAHARA Y., FUJII N., NAKA H., NAGATSU T. (1.982). Multiple forms of glycylylprolyl dipeptidyl aminopeptidase (dipeptidyl peptidase IV) in human sera from patients with hepatitis. Biom. Res., 3 (3), 265-269] y su actividad se ve afectada en diferentes situaciones patológicas; por ejemplo, se ha encontrado incrementada en pacientes con enfermedades hepatobiliares y disminuida en pacientes con artritis reumatoide, cáncer gástrico, leucemia linfocítica aguda y enfermedad de Hodking [Kasahara et al., o.c., 1982].

PIROGLUTAMIL AMINOPEPTIDASA. La actividad de piroglutamyl aminopeptidasa (E.C.3.4.19.3) en suero ha sido estudiada en relación a su capacidad para degradar la TRH circulante, e incluso se le ha asignado un papel fisiológico, puesto que la actividad disminuye en ratas hipotiroideas y aumenta tras la administración de T_4 [EMERSON C.H., WU C.F. (1.987). Thyroid status influences rat serum but not brain TRH pyroglutamyl aminopeptidase activities. Endocrinology, 120, 1.215-1.217]. Se desconoce, sin embargo, cuales son los niveles de esta enzima en suero en distintos estados patológicos.

GAMMA-GLUTAMIL AMINOPEPTIDASA. La actividad de Gamma-Glutamil transferasa (GGT) en suero medida con el sustrato gamma-glutamyl-2NNap refleja las mismas alteraciones en la actividad de esta enzima que cuando se mide con sustratos tradicionales [ARTUR Y., WELLMAN-BEDNAWSKA M., JACQUIER A., SIEST G. (1.984). Associations between serum gamma-glutamyltransferase and apolipoproteins-relationships with hepatobiliary diseases. Clin.

Chem., 30, 1.318-1.321]. Se cree que la GGT en suero procede del hígado ya que se incrementa fundamentalmente en enfermedades hepatobiliares.

Particularmente relevante resultan las variaciones de esta enzima durante el curso de metástasis hepáticas. Se acepta generalmente que la elevación de la actividad de la enzima en suero en enfermedades hepáticas está causada por el daño a las células hepáticas y consecuente liberación de la enzima al torrente circulatorio. Tal explicación parece sin embargo algo simplista dado que su actividad, por ejemplo, está comparativamente mucho más elevada en ictericias obstructivas que en hepatitis virales. Además no existe correlación entre el curso y la severidad de la enfermedad y los niveles séricos de GGT [SZCZEKLIK E., ORLOWSKI M., SZEWCZUK A. (1.961). Serum gamma-glutamyl transpeptidase activity in liver disease. Gastroenterol., 41, 353-359]. Por tanto, se especula con la posibilidad de que existan otros mecanismos que colaboren a explicar las variaciones de GGT en enfermedades hepáticas, como por ejemplo, variaciones de la tasa de síntesis de la enzima en el hígado como respuesta adaptativa a los cambios patológicos producidos. La determinación de GGT en hepatitis virales no parece tener significado diagnóstico, porque en contraste con la aldolasa y la fosfohexosa isomerasa la actividad enzimática no refleja el curso y la severidad de la enfermedad [Szceklik et. al, o.c., 1961].

Breve descripción de la invención

Se ha comprobado que ciertas aminopeptidas existentes en el suero y plasma humano y de otros animales muestran un incremento o descenso significativo en casos de pancreatitis, hepatitis y cirrosis según se indica a continuación:

1ª Las actividades de aminopeptidasas, medidas con los sustratos: leucil-, arginil- y alanil-2-naftilamida, en los casos de control.

2ª Las actividades de aminopeptidasas, medidas con los sustratos: glutamil- y cistinil-2-naftilamida, no se

alteran significativamente, con respecto a los controles, en los casos de pancreatitis, hepatitis y cirrosis.

3ª Las actividades de aminopeptidasas, medidas con los sustratos piroglutamil-, prolil- y aspartil-2-naftilamidas, 5 descienden significativamente, en relación con los sujetos sanos, en el caso de cirrosis.

4ª La actividad de gamma-glutamil aminopeptidasa sufre un incremento significativo en suero de pacientes pancreatíticos y cirróticos con respecto a los individuos 10 sanos.

5ª Las actividades de dipeptidil aminopeptidasa I, dipeptidil aminopeptidasa II y dipeptidil aminopeptidasa III se incrementan significativamente en los casos de hepatitis, pancreatitis y cirrosis con respecto a los individuos 15 normales. La actividad de dipeptidil aminopeptidasa IV se incrementa significativamente en los casos de hepatitis.

Una manera sencilla de determinar la concentración de aminopeptidas es por la hidrólisis de la aminoacil-2-naftilamina, midiendo la concentración de 2-naftilamina liberada para lo que 20 en la presente invención se utiliza un método fluorimétrico. La 2-naftilamidna puede medirse, sin necesidad del posterior acoplamiento, a 345 nm de excitación y 412 nm de emisión, siendo éste el método seguido por nosotros para la determinación de aminopeptidasas (véase material y métodos). A las enzimas que 25 hidrolizan las aminoacil-2-naftilamidas (arilamidas), y para diferenciarlas de otras aminopeptidasas que no hidrolizan a estos sustratos, se las ha denominado "arilamidasas".

Dado que la 2-naftilamina es con toda probabilidad un agente carcinógeno y no es recomendable su uso rutinario, se han 30 sintetizado otros sustratos de aminopeptidasas en los últimos años que también se utilizan en la actualidad. Nagatsu et al. [NAGATSU T., HINO M., FUYAMADA H., HAYAKAWA T., SAKAKIBARA S., NAKAGANA Y., TAKEMOTO T. (1.976). New chromogenic substrates for X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase. Anal. Biochem., 74, 466-476] 35 introdujeron las aminoacil-p-nitroanilidas como sustratos que liberan p-nitroanilina y se determinan espectroscópicamente a 380 nm. Finalmente, Prusak et al. [PRUSAK E., SIEWINSKI M., SZEWCZUK

A. (1980). A new fluorimetric method for the determination of gamma-glutamyltransferase activity in blood serum. Clin. Chim. Acta., 107, 21-26] e Imai et al. [IMAI K., HAMA T., KATO T. (1.983). Purification and properties of rat brain dipeptidyl aminopeptidase. J. Biochem., 93, 431-437], han utilizado los 7-aminoacil-4-metil-cumarinamidas como sustratos de aminopeptidasas. La 4-metil-cumarina liberada por estas enzimas puede medirse fluorimétricamente a 460 nm, con excitación a 380 nm.

Descripción detallada de la invención

10 Las actividades enzimáticas determinadas en suero frente a aminoacil-2-naftilamidas, manifiestan un comportamiento diferente según el sustrato utilizado y según la patología considerada. Sin embargo, existen similitudes en el comportamiento de algunos sustratos, de manera que se pueden encuadrar las trece activi-

15 dades en tres grupos diferentes:

1º Grupo. Aquellos que no son afectados en ningún caso en condiciones patológicas: los correspondientes a los sustratos cistinil- y glutamil-2-naftilamidas.

2º Grupo. Actividades enzimáticas que se incrementan significativamente en las tres patologías consideradas: pancreatitis, hepatitis y cirrosis. A tal grupo pertenecen las actividades medidas con los sustratos: leucil-, arginil-, alanil-, glicil-arginil- (DAP I), lisil-alanil- (DAP II) y arginil-arginil-2-naftilamidas (DAP III).

20

25

3º Grupo. Actividades enzimáticas que afectan a alguna de las enfermedades estudiadas pero no a todas. Evidentemente este es el grupo más heterogéneo pues tres actividades, prolil-, piroglutamil- y aspartil-2-naftilamidas muestran sólo un descenso significativo en caso de cirrosis; la actividad de DAP IV (glicil-prolil-2-naftilamida) muestra un in-

30

naftilamida se incrementa significativamente en casos de pancreatitis y cirrosis pero no en el caso de hepatitis.

35

Actividad de cistinil aminopeptidasa (1º grupo). Esta actividad enzimática sufre un incremento progresivo en suero en los casos de embarazo a partir del segundo trimestre de la gestación y desciende bruscamente inmediatamente después del parto (Spellacy et al., o.c., 1977). Parece que la enzima responsable de esta actividad procede de la placenta y sólo en los casos de alteraciones de la función feto-placentaria este comportamiento se vería perturbado. No se ha descrito ninguna otra alteración fisiológica o patológica que desvie las actividades de cistinil aminopeptidasa en suero de sus niveles normales. Sin embargo, los valores de los niveles medios de actividad de cistinil aminopeptidasa se encuentran elevados (aunque no significativamente) en las tres enfermedades con respecto a los controles (figura 1).

Actividad de glutamil aminopeptidasa (1º grupo). Como en el caso anterior, esta actividad no se afecta significativamente en ninguno de los procesos patológicos estudiados aunque existe un ligero descenso en los casos de pancreatitis, sin llegar a ser significativo (figura 2).

Leucil-, arginil- y alanil- aminopeptidasas (2º grupo). Estas tres actividades enzimáticas experimentan un incremento muy significativo en los procesos pancreáticos y cirróticos y algo menor, aunque significativo, en los casos de hepatitis (figuras 3, 4 y 5).

Dada la inespecificidad de los incrementos de estas actividades enzimáticas en las condiciones patológicas, resulta obvio que estas actividades enzimáticas no posean valor en el diagnóstico diferencial, aunque pudieran constituir un reflejo como indicador de la evolución y del grado de afectación celular, e incluso del pronóstico, de estos procesos patológicos como lo son otras determinaciones analíticas rutinarias.

Actividades de dap i, dap ii, y dap iii (2º grupo). Como en el caso anterior estas tres DAP sufren un incremento significativo en los tres procesos patológicos estudiados (figuras 6 y 7). Además, el incremento porcentual con respecto a los controles es mucho mayor en estos casos que en los anteriores aunque la actividad enzimática para estos sustratos resulta muchísimo menor (tres órdenes de magnitud) que en los casos anteriores y, por

tanto, la determinación de estas enzimas necesita un mayor periodo de incubación.

Al igual que para la alanil aminopeptidasa, dada la inespecificidad de los incrementos de actividad enzimática, estos
5 resultados no tienen valor diagnóstico específico, aunque tal vez puedan ser útiles en el pronóstico y la evolución.

La actividad de DAO III se encuentra significativamente incrementada en los tres procesos patológicos, del mismo modo que la DAP I y DAP II, aunque su procedencia subcelular sea
10 diferente, puesto que la DAP III es una enzima citosólica.

Prolil-, piroglutamil- y aspartil-aminopeptidasas (3º grupo). Las actividades enzimáticas de los sustratos prolil-, piroglutamil- y aspartil-2-naftilamida muestran un comportamiento similar en las condiciones patológicas diferente al resto de las actividades
15 de AP determinadas en las mismas circunstancias. En los tres casos se detecta un descenso significativo en los procesos cirróticos en comparación con los individuos normales, mientras que los niveles enzimáticos no sufren alteración ni en los casos de hepatitis ni en los de pancreatitis.

20 De las tres actividades, la que produce un descenso más significativo es la piroglutamil aminopeptidasa que desciende prácticamente un 50% con respecto a los controles cualquiera que sea el tipo de cirrosis considerada (figura 9).

La actividad de aspartil aminopeptidasa también sufre un
25 descenso significativo en los casos de cirrosis (figura 10), aunque porcentualmente menor (35%) que en la piroglutamil aminopeptidasa.

La prolil aminopeptidasa se comporta de forma similar a las dos actividades anteriores, es decir, desciende
30 significativamente en el caso de cirrosis hepáticas (figura 11).

De las tres aminopeptidasas que muestran un descenso significativo de su actividad en los casos de cirrosis hepáticas,

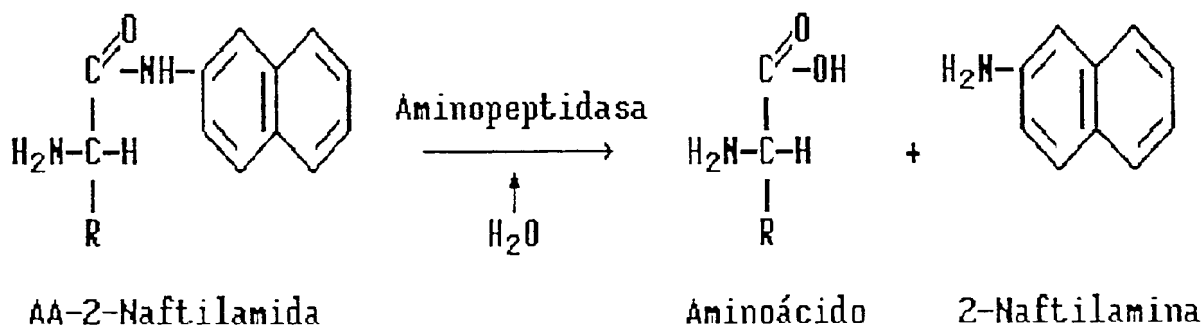
35 aspartil- y la prolil-aminopeptidasa. Por tanto la actividad de esta enzima puede llegar a ser un "marcador" útil para el diagnóstico bioquímico de las cirrosis hepáticas.

Glicil-prolil aminopeptidasa (dap iv) (3º grupo). La actividad de dipeptidil aminopeptidasa IV (DAP IV) también muestra una variación selectiva para los casos de hepatitis, concretamente experimenta un incremento muy significativo cuyo promedio es el
 5 43% sobre el promedio de los valores control. Ni los casos de pancreatitis ni los de cirrosis sufren variaciones significativas de los niveles de esta enzima en suero (figura 12).

Gamma-glutamyl aminopeptidasa (3º grupo). La actividad de gamma-glutamyl aminopeptidasa se incrementa significativamente tanto
 10 en pacientes con pancreatitis como en los casos de cirrosis hepáticas. El incremento medio obtenido en los casos de hepatitis no llega a ser estadísticamente significativo. En todos los casos patológicos, sin embargo, es destacable el elevado valor de la desviación típica, lo que indica la amplia variación de los
 15 niveles de esta enzima en suero en estas circunstancias (figura 13).

Los sustratos utilizados para la determinación fluorimétrica de aminopeptidasas resultan de la condensación de la 2-naftil-amina y el grupo carboxílico de los distintos aminoácidos para
 20 las aminopeptidasas, (o con el grupo carboxílico libre de los dipéptidos para las dipeptidil aminopeptidasas). Se forma así un enlace amido (peptídico) susceptible de ser hidrolizado por estas enzimas, que liberarían equimolecularmente el aminoácido (o dipéptido) y la 2-naftilamina.

25



La 2-naftilamina liberada fluoresce a 412 nm de emisión cuando se la excita con una longitud de onda de 345 nm. La fluorescencia producida durante un intervalo determinado de tiempo es el reflejo de la actividad enzimática de la muestra y puede transformarse en medidas de actividad enzimática mediante curvas de calibración, determinando la fluorescencia producida por concentraciones crecientes de 2-naftilamina disueltas en el mismo buffer que en el que se determina la actividad enzimática.

Técnica analítica

10 Preparación de las disoluciones de los sustratos

Los sustratos utilizados, su peso molecular, la cantidad pesada y la concentración final vienen expresadas en la Tabla 1

Cada pesada fue inicialmente disuelta en 2 ml de dimetilsulfóxido (DMSO) (solución madre) a partir de la cual se obtienen las cantidades adecuadas en función de las necesidades diarias. Cada solución fue suplementada con ditionitrosol (DTT) 10 mg por cada 100 cc y albúmina bovina 10 mg por cada 100 cc.

Reacción enzimática

20 Para llevar a cabo la reacción enzimática se utilizó 1 ml de las soluciones de sustratos previamente reseñadas, a las que se añadía 10 μ l (para el caso de leucil-, arginil-, alanil- y cistinil-2-naftilamidas) ó 25 μ l (para los restantes sustratos) de la muestra del suero a analizar. Cada determinación se realizó por triplicado, y tras agitación vortex se incubó a 37 °C durante 25 30 minutos (para leucil-, arginil-, alanil- y cistinil-2-naftilamidas) y 240 minutos para los restantes sustratos. En todos los casos las reacciones enzimáticas fueron detenidas mediante la adición de 1 ml de buffer acetato 100 mM pH 4.2 y 30 posterior agitación.

Cada serie de mediciones constaba de un blanco preparado según la misma pauta que las muestras, en las que el suero era

35 La lectura se llevaba a cabo en cubetas de cuarzo de 1 cm de paso de luz, previa calibración del espectrofluorímetro mediante la banda Raman del agua a 350 nm de excitación y 397 nm de

emisión. Posteriormente se seleccionaban las longitudes de onda de la 2-naftilamina (335 nm de excitación y 412 nm de emisión) y se compensaba el valor del blanco automáticamente.

5 Las lecturas de las muestras en unidades de fluorescencia se transformaban, mediante rectas de calibración, en nanomoles de 2-naftilamina por minuto de incubación y por litro de suero, (nmol/min/l) para los sustratos, leucil-, arginil-, alanil- y cistinil-2-naftilamidas y en picomoles, minuto y litro (pmol/min/l) para los restantes sustratos.

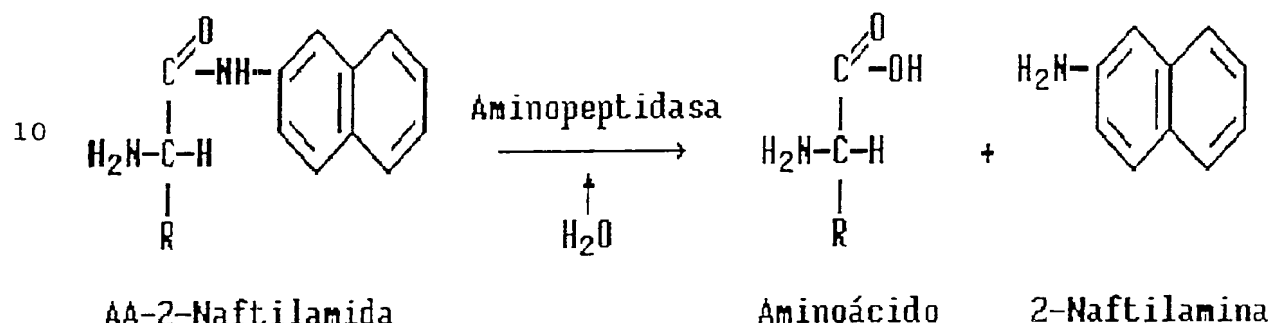
10

TABLA 1

SUSTRATO	P.M.	PESADA (mg)	DISOLVENTE (100 ml buffer)	MOLARIDAD (μ M)
L-Leucil-2NNap ClH	298.2	2.928	b. fosfato pH 7.4	100
L-Arginil-2NNap ClH	333.8	3.358	b. fosfato pH 7.4	100
L-Alanil-2NNap	214.3	2.143	b. fosfato pH 7.4	100
L-Cistinil-2NNap 2ClH	563.3	2.816	b. fosfato pH 7.4	50
L-Prolil-2NNap ClH	276.8	1.384	b. fosfato pH 7.4	50
L-Piroglutamil-2NNap	254.3	1.271	b. fosfato pH 7.4	50
L-Aspartil-2NNap	258.3	1.291	b. fosfato pH 7.4	50
L- γ -Glutamil-2NNap	272.3	1.361	b. fosfato pH 7.4	50
Glicil-L-Arginil-2NNap ClH	392.5	1.962	b. fosfato pH 6	50
L-Lisil-L-Alanil-2NNap	342.0	1.710	b. fosfato pH 6	50
L-Arginil-L-Arginil -2NNap 3ClH 1.75AcOH	564.5	2.822	b. Tris ClH pH 9	50
Glicil-Prolil-2NNap	397.0	1.485	b. fosfato pH 7.4	50
L- α -Glutamil-2NNap 1/2 AcOH 1/2 H ₂ O	311.3	1.556	b. fosfato pH 7.4	50

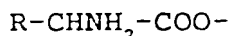
REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de hidrólisis y utilización de aminoacil-naftilamida como reactivo de diagnóstico, mediante la medida de la fluorescencia de la 2-naftilamina liberada por la acción hidrolítica de aminopetidasa, relacionadas con ciertas patologías del organismo:



20 pudiendo, por razones de seguridad en su manejo ser sustituida la 2-naftilamina por 4-aminoacil-4-metil-cumarinamidas sin que ello afecte a la naturaleza de la presente invención.

2. Procedimiento de hidrólisis y utilización de aminoacil-naftilamida como reactivo de diagnóstico, según la reivindicación 1, donde aminoacil (AA) es el radical



25 de uno de los siguientes aminoácidos o péptidos: leucina, ácido aspártico, alanina, arginina, prolina, glicil-prolina, arginil-arginina, lisil-alanina, glicil-arginina, ácido piroglutámico y ácido gammaglutámico.

3. Procedimiento de hidrólisis y utilización de aminoacil-2-naftilamida como reactivo de diagnóstico, según las reivindicaciones 1 y 2, en el que una disolución del substrato en dimetilsulfóxido, debidamente suplementada, se mezcla con la cantidad apropiada del suero a analizar, incubando a 37 °C un tiempo exactamente medido, tras el cual se congela la reacción

35 por adición de un buffer de acetato.

4. Procedimiento de hidrólisis y utilización de aminoacil-2-

naftilamida como reactivo de diagnóstico, según las reivindicaciones 1 a 3, en el que la lectura se lleva a cabo en un espectrofluorímetro con una excitación de 345 nm y una emisión de 412 nm.

- 5 5. Procedimiento de hidrólisis y utilización de aminoacil-2-naftilamida como reactivo de diagnóstico, según las reivindicaciones 1 a 4, que utiliza la actividad de aminopeptidasas en suero para el diagnóstico bioquímico de la cirrosis hepática.

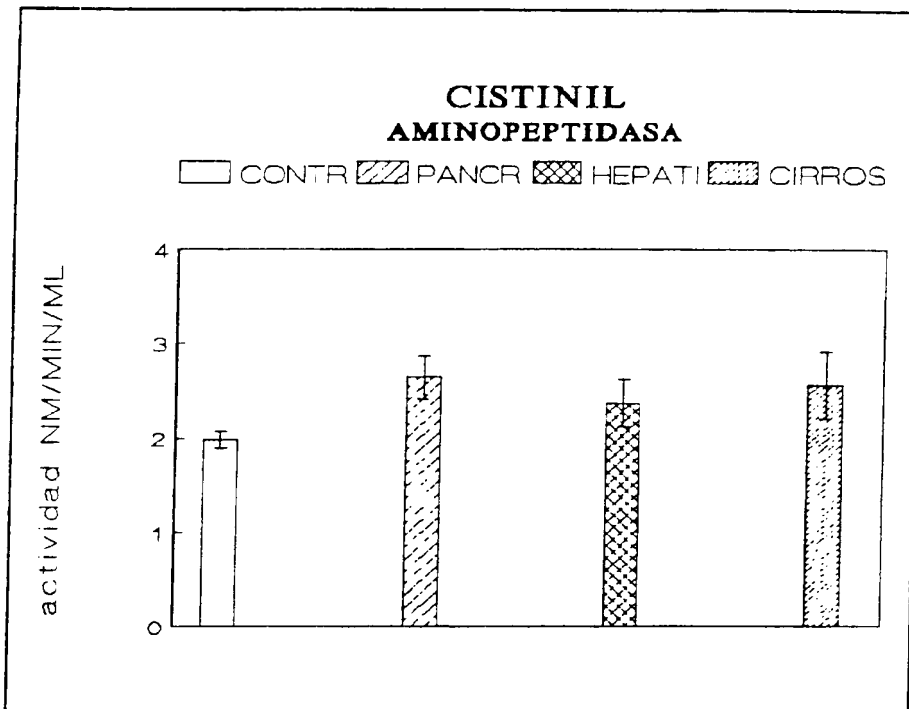


Figura 1.- No significativa respecto a los controles

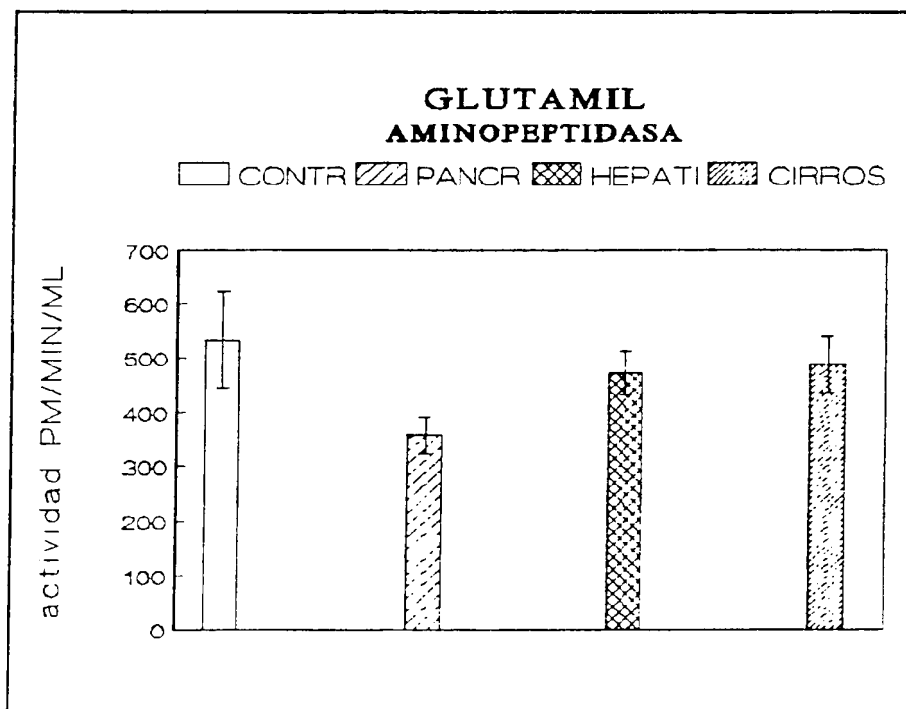


Figura 2.- No significativa respecto a los controles

HOJA SUSTITUIDA

2/7

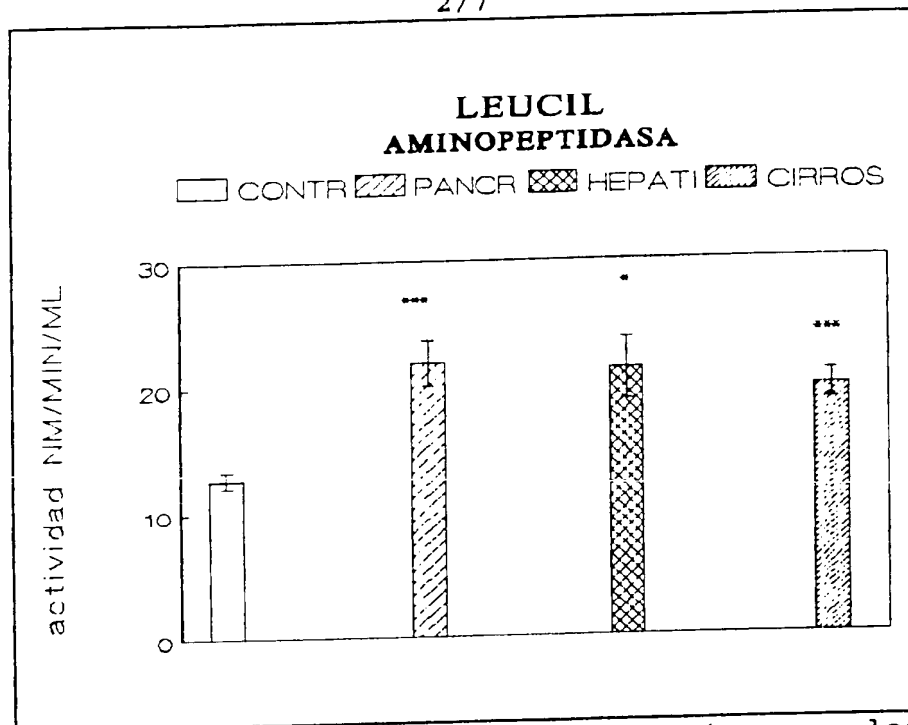


Figura 3.- Significación respecto a los controles:*** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$

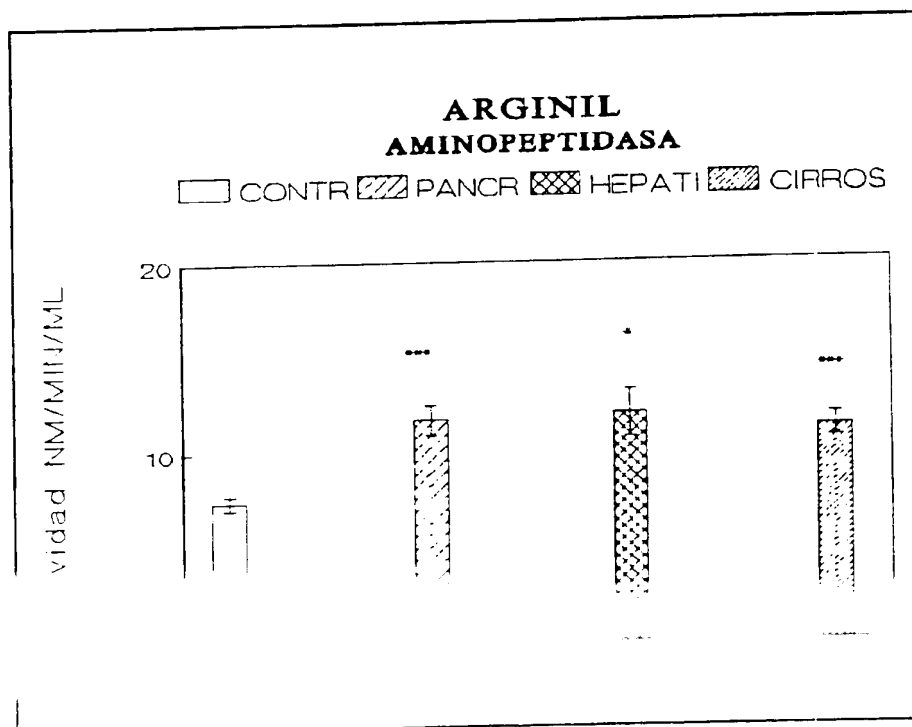


Figura 4.- Significación respecto a los controles:*** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$.

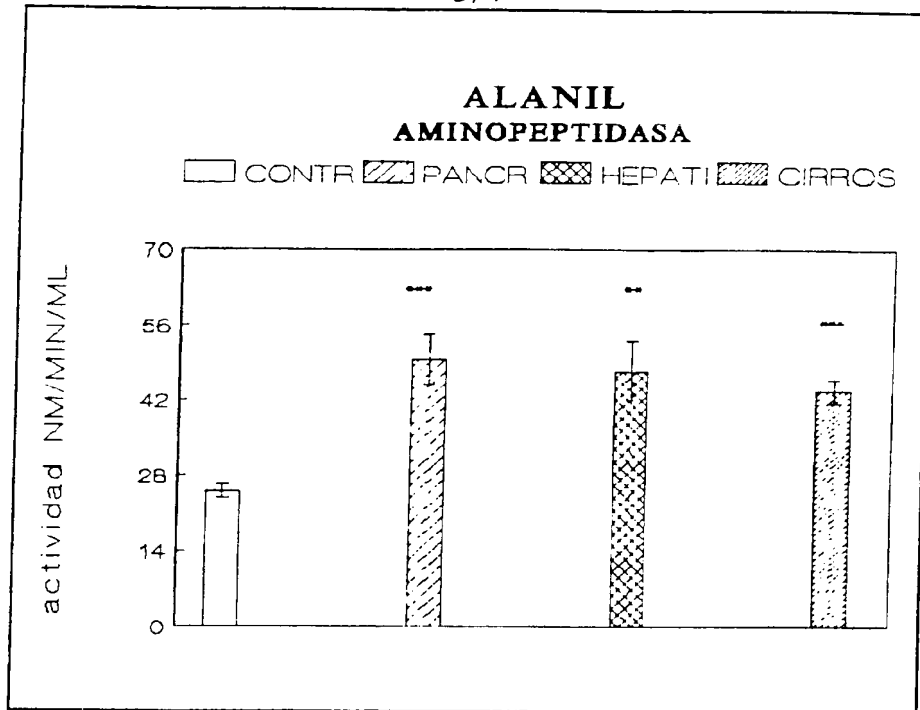


Figura 5.- Significación respecto a los controles: *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$.

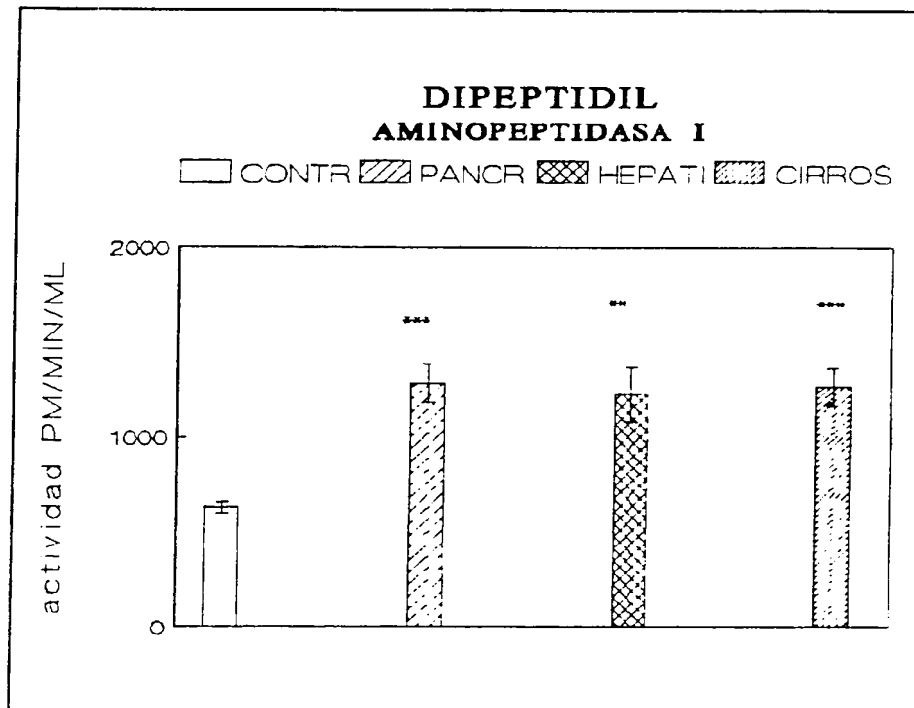


Figura 6.- Significación respecto a los controles: *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$.

4/7

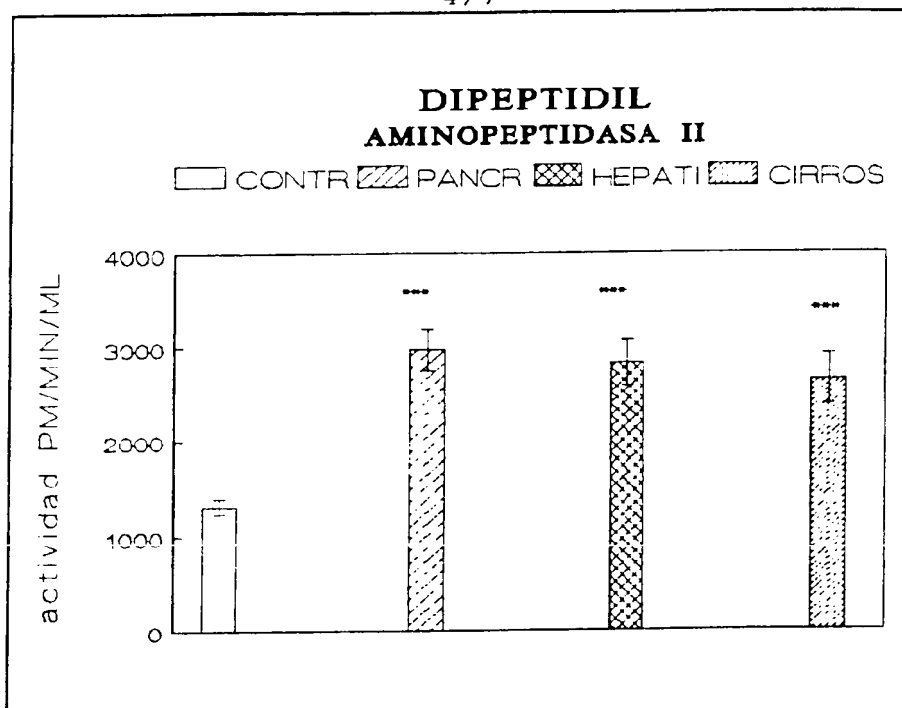
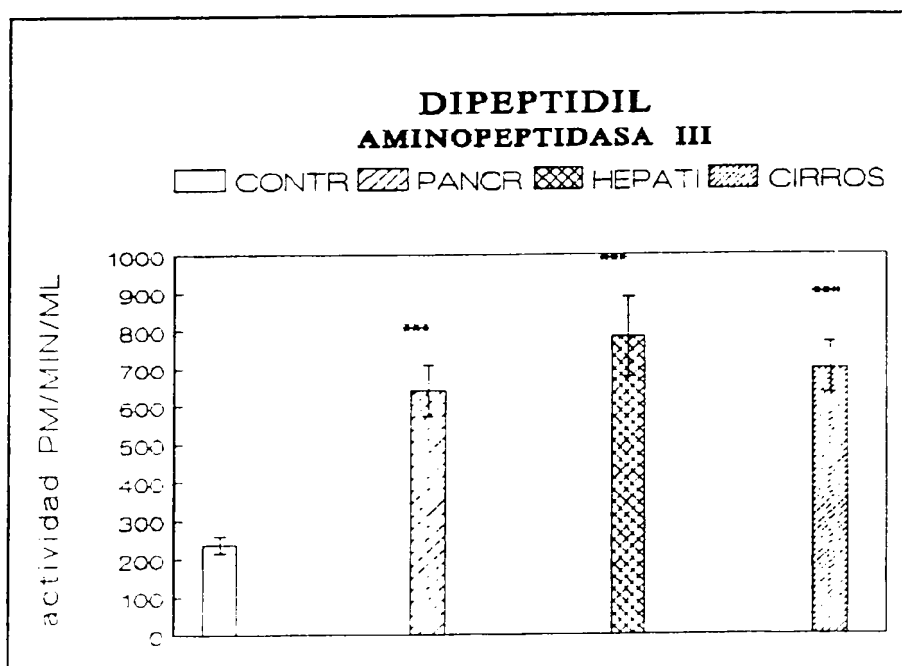


Figura 7.- Significación respecto a los controles: *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$.



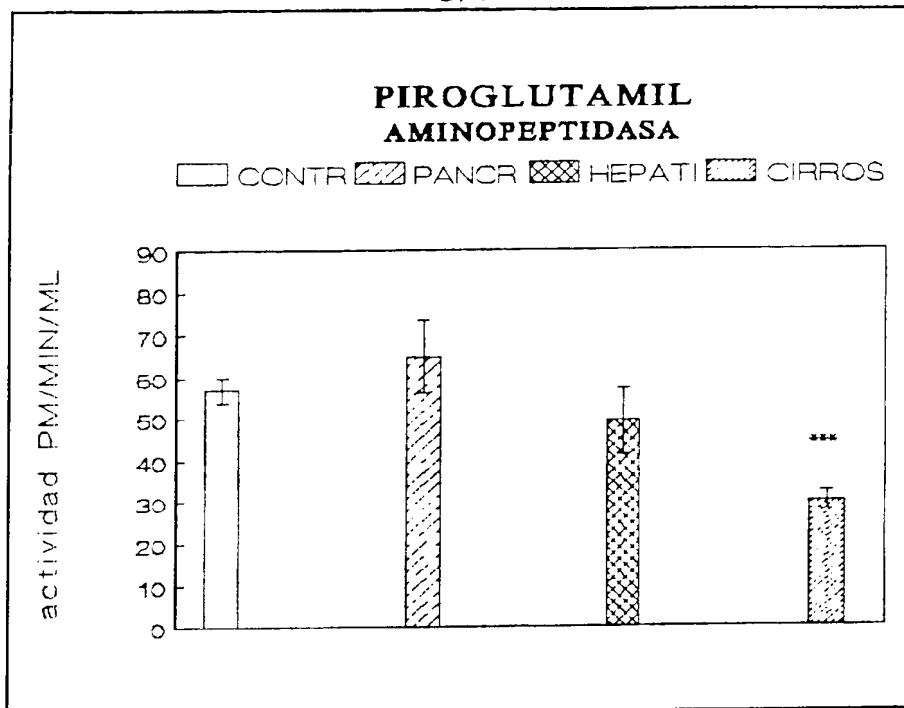


Figura 9.- Significación respecto a los controles: *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$.

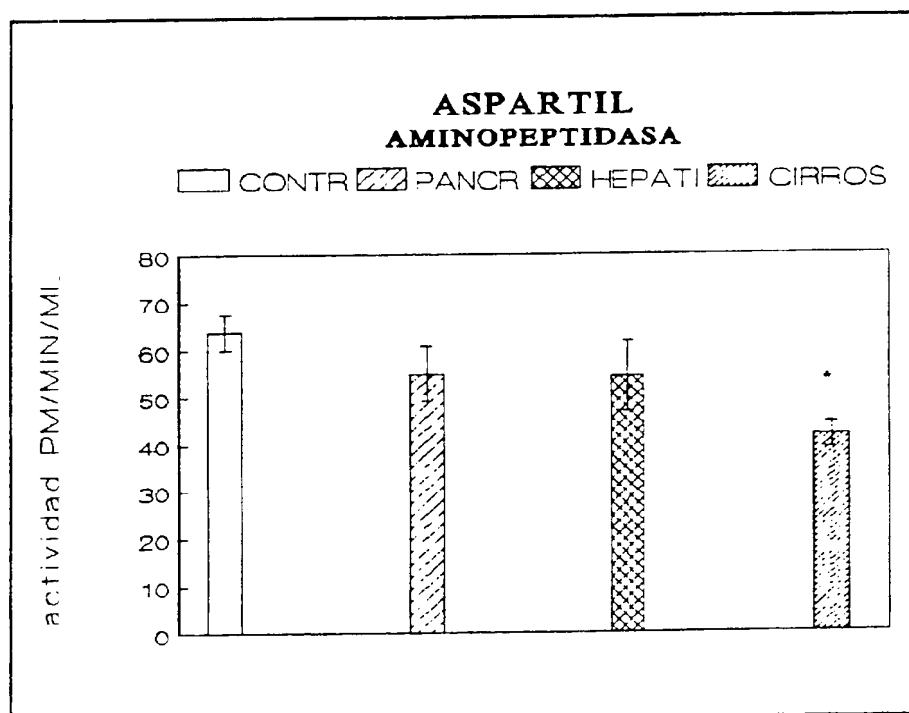


Figura 10.- Significación respecto a los controles: *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$.

HOJA SUSTITUIDA

6/7

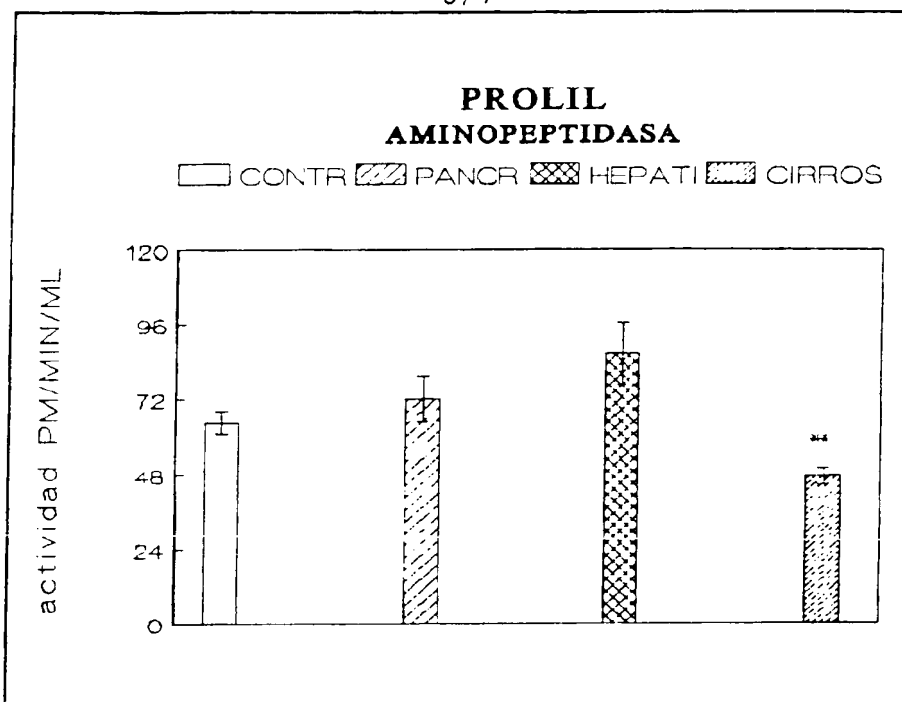
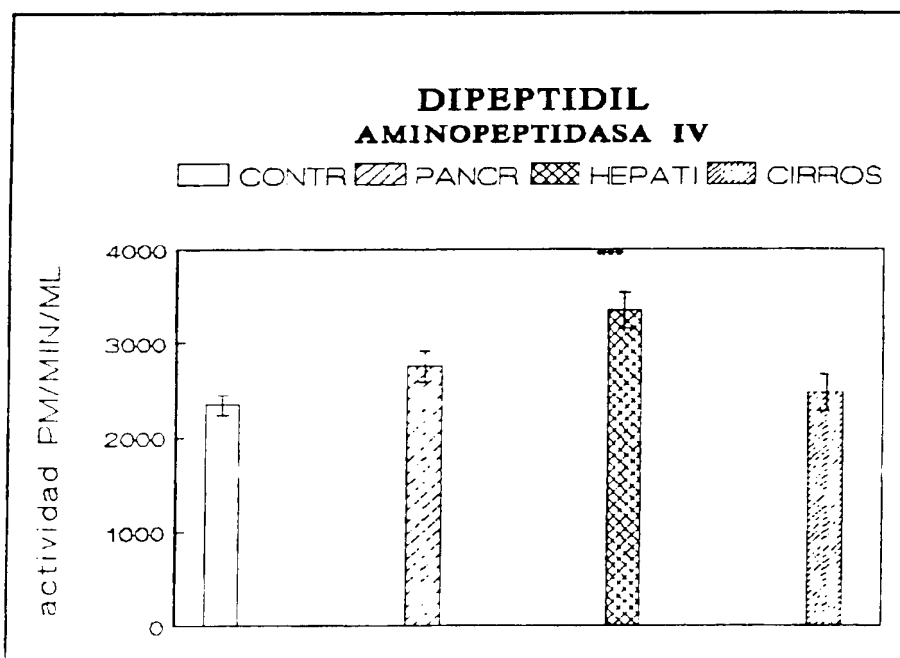


Figura 11.- Significación respecto a los controles: *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$.



CONTR: *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$.

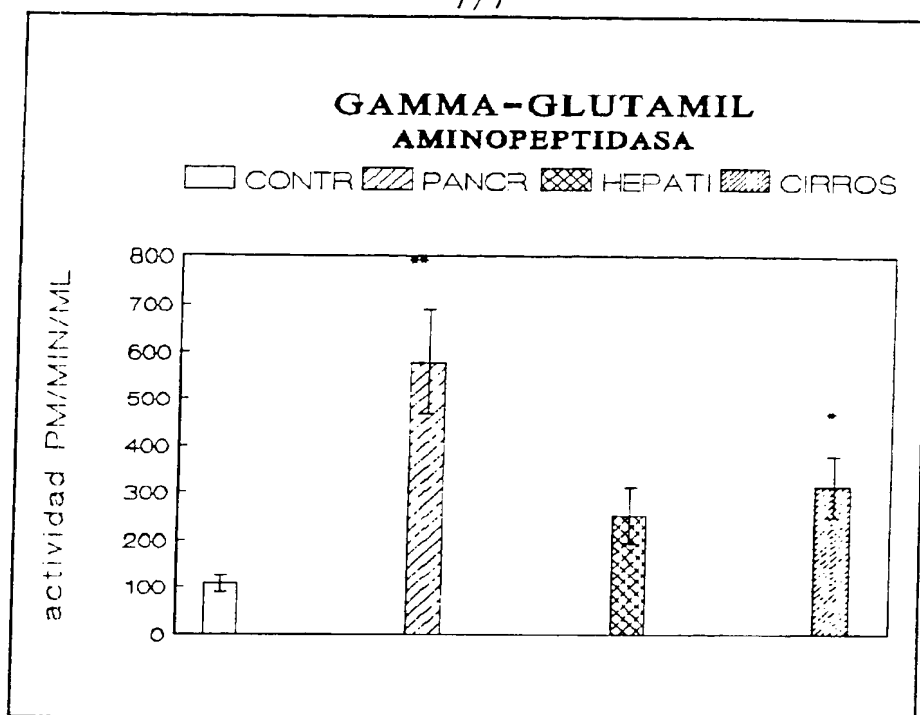


Figura 13.- Significación respecto a los controles: *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/ES 91/00071

International Application No

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) *		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int. Cl. 5 Cl2Q1/37		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched ⁷		
Classification System	Classification Symbols	
Int. Cl. 5	Cl2Q	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁸		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁹		
Category ⁹	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
X	J.Dent.Res., vol. 65, No. 11, 1986 H. Suido et al.: "Arylaminopeptidase activities of oral bacteria", see pages 1135-1340, see summary and table No. 2	1-4
X	US,A, 4208480 (R.F. D'AMATO et al.) 17 June 1980, see column 4, line 67 -column 5, line 34	1-4
X	US,A, 4147692 (Y. TOSHIHARU et al.) 3 April 1979, see summary and column 2, line 56 - column 3, line 10	1-5
X	EP,A,0113996 (TAISHO PHARMACEUTICAL CO. LTD) 25 July 1984, see page 12, lines 5-10 and claims 1,3	1-4
<p>* Special categories of cited documents: ¹⁰</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>¹⁴ documents of the same patent family</p>		
CERTIFICATION		
I hereby certify that the International Search Report has been prepared in accordance with the provisions of Article 17 of the Patent Cooperation Treaty and the Regulations thereunder.		
3 February 1992 (03.02.92)	27 February 1992 (27.02.92)	
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer	
EUROPEAN PATENT OFFICE		

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.

ES 9100071

SA 53613

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 17/02/92. The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US-A- 4208480	17-06-80	None	
US-A- 4147692	03-04-79	JP-C- 1356548	13-01-87
		JP-A- 53105477	13-09-78
		JP-B- 61026558	20-06-86
		JP-A- 54005976	17-01-79
		DE-A- 2808111	31-08-78
		FR-A- 2381764	22-09-78
		GB-A- 1547747	27-06-79
		SE-A- 7801997	27-08-78
		US-A- 4191809	04-03-80
EP-A- 0113996	25-07-84	JP-A- 59112952	29-06-84
		US-A- 4507232	26-03-85

EPO FORM P0479

For more details about this annex : see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional N° PCT/ES 91/00071

I. CLASIFICACION DE LA INVENCIÓN (caso de ser aplicables varios símbolos de clasificación, indicarlos todos) ⁶		
Según la clasificación internacional de patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP Int.Cl. ⁵ : C 12 Q 1/37		
II. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BUSQUEDA		
Documentación mínima consultada ⁷		
Sistema de clasificación		Símbolos de clasificación
Int.Cl. ⁵ : C 12 Q		
Otra documentación consultada además de la documentación mínima en la medida en que tales documentos forman parte de los sectores comprendidos por la búsqueda ⁸		
III. DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES ⁹		
Categoría *	Identificación de los documentos citados, ¹¹ con indicación, en caso necesario, de los pasajes pertinentes ¹²	Nº de las reivindicaciones a las que se refieren ¹³
X	J. Dent. Res., vol. 65, no. 11, 1986, H. Suido et al.: "Arylaminopeptidase activities of oral bacteria", páginas 1135-1340, ver resumen y tabla no. 2	1-4
X	US, A, 4208480 (R.F. D'AMATO et al.) 17 Junio 1980, ver columna 4, línea 67 - columna 5, línea 34	1-4
X	US, A, 4147692 (Y. TOSHIHARU et al.) 3 Abril 1979, ver resumen y columna 2, línea 56 - columna 3, línea 10	1-5
X	EP, A, 0113996 (TAISHO PHARMACEUTICAL CO. LTD) 25 Julio 1984, ver página 12, líneas 5-10 y reivindicaciones 1,3	1-4

<p>* Categorías especiales de documentos citados: ¹⁰</p> <p>"A" documento que define el estado general de la técnica, no considerado como particularmente pertinente</p> <p>"E" documento anterior, publicado ya sea en la fecha de presentación internacional o con posterioridad a la misma</p> <p>"L" documento que pueda plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada)</p> <p>"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a un empleo, a una exposición o a cualquier otro tipo de medio</p> <p>"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de prioridad y que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita para comprender el principio o la técnica que constituye la base de la invención</p> <p>"X" documento particularmente pertinente: la invención reivindicada no puede considerarse como nueva ni que implique una actividad inventiva</p> <p>"Y" documento particularmente pertinente: la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia</p>		
CERTIFICACION		
Fecha en la que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional 3 Febrero 1992		Fecha de expedición del presente informe de búsqueda internacional 27 FEB 1992
Administración encargada de la búsqueda internacional OFICINA EUROPEA DE PATENTES		Firma del funcionario autorizado MISS T. TAZELAN

ANEXO AL INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL RELATIVO A ES 91000/1
LA SOLICITUD INTERNACIONAL DE PATENTE N° SA 53513

Este anexo enumera los miembros de familias de patentes relativos a los documentos de patentes citados en el informe de búsqueda internacional mencionado.
 Los miembros aparecen tal como están contenidos en el archivo EDP de la Oficina Europea de Patentes al 17/02/92.
 La Oficina Europea de Patentes está exenta de responsabilidad por estos datos, que se facilitan a fines de información solamente.

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Membrio(s) de familia de patentes	Fecha de publicación
US-A- 4208480	17-06-80		
US-A- 4147692	03-04-79	JP-C- 1356548	13-01-87
		JP-A- 53105477	13-09-78
		JP-B- 61026558	20-06-86
		JP-A- 54005976	17-01-79
		DE-A- 2808111	31-08-78
		FR-A- 2381764	22-09-78
		GB-A- 1547747	27-06-79
		SE-A- 7801997	27-08-78
		US-A- 4191809	04-03-80
EP-A- 0113996	25-07-84	JP-A- 59112952	29-06-84
		US-A- 4507232	26-03-85

Para mayor información sobre este Anexo: véase el Diario Oficial de la Oficina Europea de Patentes, N° 12/82